

## Process for the preparation of cyclooctaamylose

**Publication number:** DE3317064

**Publication date:** 1984-11-15

**Inventor:** BENDER HANS-FRIEDRICH DR (DE)

**Applicant:** CONSORTIUM ELEKTROCHEM IND (DE)

**Classification:**

- **International:** *C08B37/16; C12P19/18; C08B37/00; C12P19/00;*  
(IPC1-7): C08B37/16; C12P19/18

- **European:** C08B37/00M2B; C12P19/18

**Application number:** DE19833317064 19830510

**Priority number(s):** DE19833317064 19830510

**Also published as:**



JP60006704 (A)

[Report a data error here](#)

### Abstract of DE3317064

The invention relates to a process for the preparation of cyclooctaamylose by enzymatic cleavage of starch and subsequent fractionation of the cleavage products, in which cyclodextrin glycosyltransferase is added to an aqueous preparation of starch, and bromobenzene is added to the starch preparation at least after the amount of initially formed cyclodextrin no longer increases.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift  
⑪ DE 33 17 064 A 1

⑤1 Int. Cl. 3:  
C 08 B 37/16  
C 12 P 19/18

②1 Aktenzeichen: P 33 17 064.9  
②2 Anmeldetag: 10. 5. 83  
④3 Offenlegungstag: 15. 11. 84

DE 33 17 064 A 1

⑦1 Anmelder:

Consortium für elektrochemische Industrie GmbH,  
8000 München, DE

⑦2 Erfinder:

Bender, Hans-Friedrich, Dr., 7803 Gundelfingen, DE

Behördeneigentlich

⑤4 Verfahren zur Herstellung von Cyclooctaamylose

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Cyclooctaamylose durch enzymatische Spaltung von Stärke und anschließende Auftrennung der Spaltprodukte, wobei einer wäßrigen Zubereitung von Stärke Cyclodextrin-glykosyltransferase zugegeben wird und zumindest nachdem die Menge an primär gebildetem Cyclodextrin nicht mehr zunimmt, die Stärkezubereitung mit Brombenzol versetzt wird.

DE 33 17 064 A 1

10.05.83

3317064

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Herstellung von Cyclooctaamylose durch enzymatische Spaltung von Stärke und anschließender Auftrennung der Spaltprodukte, d a d u r c h g e - k e n n z e i c h n e t , daß
  - a) einer wäßrigen Zubereitung von Stärke Cyclodextrin-glykosyltransferase zugegeben wird und
  - b) zumindest nachdem die Menge an primär gebildetem Cyclodextrin nicht mehr zunimmt, die Zubereitung gemäß a) mit Brombenzol versetzt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e - k e n n z e i c h n e t , daß die wäßrige Zubereitung von Stärke vor der Zugabe von Cyclodextringlykosyltransferase mit Alkalisalzen kurzkettiger Alkansäuren versetzt wird.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß bei der Auftrennung der Spaltprodukte Cyclooctaamylose aus pyridinischer Suspension durch Zugabe von Alkohol gewonnen wird.

Verfahren zur Herstellung von Cyclooctaamylose

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Cyclooctaamylose, im weiteren auch als  $\gamma$ -Cyclodextrin bezeichnet, durch enzymatische Spaltung von Stärke und anschließende Auftrennung der Spaltprodukte.

$\gamma$ -Cyclodextrin ist relativ gut wasserlöslich, besitzt einen hydrophoben Torus von ca. 10 Angström Durchmesser, in den Gastmoleküle eingeschlossen werden können. Aufgrund dieser Eigenschaften ist  $\gamma$ -Cyclodextrin ein an sich begehrter Einsatzstoff u.a. auf dem Arzneimittelsektor, auf den Gebieten des Pflanzenschutzes, der Kosmetik oder in der Nahrungsmittelindustrie.

Gemäß EP-OS 45 464 ist es Stand der Technik, Cyclodextrine aus Stärkehydrolysaten durch Fällung mit z.B. Brombenzol abzutrennen. Aus der genannten Veröffentlichung ist es ferner bekannt,  $\gamma$ -Cyclodextrin aus Stärke durch enzymatische Spaltung zu gewinnen und aus dem Reaktionsprodukt mit Hilfe chromatographischer Methoden zu isolieren.

Generell ist festzustellen, daß die bekannten Herstellungsmethoden für  $\gamma$ -Cyclodextrin so aufwendig und damit so kostenintensiv sind, daß  $\gamma$ -Cyclodextrin bisher nicht die an sich durch seine Eigenschaften begründete breite industrielle Nutzung finden konnte.

Aufgabe der Erfindung war es, ein Verfahren zur Herstellung von Cyclooctaamylose zu entwickeln, das verbesserte Ausbeuten liefert.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Cyclooctaamylose durch enzymatische Spaltung von Stärke und anschließender Auftrennung der Spaltprodukte, das dadurch gekennzeichnet ist, daß

- a) einer wäßrigen Zubereitung von Stärke Cyclodextrin-glykosyltransferase zugegeben wird und
- b) zumindest nachdem die Menge an primär gebildetem Cyclo-dextrin nicht mehr zunimmt, die Zubereitung gemäß a) mit Brombenzol versetzt wird.

Grundsätzlich kann erfindungsgemäß jede Art von Stärke, einschließlich nativer Stärke oder Stärke-Partialhydrolysate, eingesetzt werden. Beispiele sind Kartoffelstärke, Maisstärke, Maniokstärke u.a.

Als wäßrige Zubereitungen von Stärke können alle wäßrigen Zubereitungen eingesetzt werden, die auch bereits bisher zur enzymatischen Spaltung von Stärke verwendet werden konnten. Es sind dies insbesondere 5 bis 30 Gew.-%-ige wäßrige Lösungen von gelifizierter Stärke. Sie werden im einfachsten Fall durch Kochen entsprechender Mengen von Stärke in Wasser gewonnen.

Die genannten Zubereitungen enthalten zur Enzymstabilisierung zumeist kleinere Mengen an Calciumchlorid, insbesondere ca. 5 mMol Calciumchlorid/l.

Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäß einer enzymatischen Spaltungsreaktion zu unterwerfenden Stärkezubereitungen weiterhin Alkalisalze kurzkettiger Alkansäuren. Die Mengen betragen zweckmäßigerweise 5 bis 300 mMol/l Stärkezubereitung. Beispiele für die genannten Alkalisalze sind Natriumformiat, Kaliumformiat, Natriumacetat, Kaliumacetat, Natriumpropionat, Kaliumpropionat u.a., insbesondere Natriumacetat. Durch diese Maßnahme wird die Bildung von Cyclooctaamylose begünstigt.

Den genannten Stärkezubereitungen wird nun das an sich bekannte Enzym Cyclodextringlykosyltransferase zugegeben. Als Quelle für dieses Enzym dienen Mikroorganismen, wie *Bacillus macerans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearo-thermophilus*, *Micrococcus* spp., alkalophiler *Bacillus* (z.B. *Bacillus* Nr. 38-2 oder 17-1), *Klebsiella pneumoniae*, insbesondere *Klebsiella pneumoniae*.

Das Enzym wird vorzugsweise in solchen Mengen zugegeben, daß das Gewichtsverhältnis von Enzym : Stärke 1 : 2000 bis 1 : 10 000, insbesondere 1 : 4000 bis 1 : 5000 beträgt.

Die Spaltungsreaktion wird bei Temperaturen von 30 bis 55 °C, insbesondere 40 bis 45 °C unter Rühren durchgeführt. Der pH-Wert der Stärkezubereitung beträgt 4,5 bis 7,9.

Vorzugsweise wird ein Teil der Enzymmenge, ca. 10 bis 40 Gew.-%, insbesondere 25 bis 35 Gew.-%, der Gesamtmenge des eingesetzten Enzyms bereits bei einer Temperatur des Reaktionsgemisches von 60 bis 70 °C zugegeben. Danach wird das Reaktionsgemisch unter Rühren auf eine Temperatur von 30 bis 55 °C abgekühlt und schließlich die restliche Menge an Enzym zudosiert.

Der Fortschritt der enzymatischen Spaltungsreaktion kann beispielsweise durch Probenentnahme und chromatographische Analyse überwacht werden. Als Maßstab hierfür dient die Menge der sich primär bildenden Cyclodextrine. Abhängig von der Abstammung der Cyclodextringlykosyltransferase ist dies in der überwiegenden Menge  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Cyclodextrin. Beispielsweise bildet die Cyclodextringlykosyltransferase von *Bacillus macerans* und von *Klebsiella pneumoniae* in der überwiegenden Menge  $\alpha$ -Cyclodextrin, während die Cyclodextringlykosyltransferase des alkalophilen *Bacillus* primär überwiegend  $\beta$ -Cyclodextrin bildet.

Die enzymatische Spaltungsreaktion führt schließlich zu einem Zustand, in dem die Menge dieser primär gebildeten Cyclodextrine im Reaktionsgemisch nicht mehr zunimmt. Zumindest nachdem dieses Stadium erreicht ist, wird erfindungsgemäß Brombenzol zugegeben. Typische Inkubationszeiten bis zum Erreichen dieses Stadiums sind 5 bis 9 Stunden. Zweckmäßigerweise erfolgt die Brombenzolzugabe erst, wenn mehr als 50 Gew.-%, insbesondere mehr als 70 Gew.-%, an sich primär bildendem Cyclodextrin im Reaktionsgemisch vorliegt.

Durch Zugabe von Brombenzol fallen  $\beta$ -Cyclodextrin und  $\gamma$ -Cyclodextrin als schwerlösliche Clathrate aus. Die eingesetzte Menge an Brombenzol ist, bezogen auf die Menge im Reaktionsgemisch anwesender und sich weiterbildender Cyclodextrine mindestens äquimolar. Vorzugsweise wird jedoch, bezogen auf die genannte Menge anfallender Cyclodextrine ein 1,5- bis 10-facher, insbesondere ein 2- bis 3-facher molarer Überschuß an Brombenzol zugesetzt.

Danach wird das Reaktionsgemisch bei 30 bis 50 °C, insbesondere bei 40 bis 45 °C, weitergerührt bis keine Zunahme an Zielprodukt (Cyclooctaamylose) mehr festgestellt wird. Die Reaktionskontrolle kann beispielsweise durch Probenentnahme und chromatographische Analyse erfolgen. Typische Gesamtinkubationszeiten bis zum Endpunkt der Reaktion sind 24 bis 48 Stunden.

Zur Aufarbeitung des Reaktionsgemisches werden zunächst die Feststoffe durch z.B. Dekantieren, Filtrieren, Zentrifugieren und dergleichen abgetrennt. Das Zielprodukt liegt als Feststoff (Brombenzol-Clathrat) im Gemisch mit Brombenzol-Clathrat des  $\beta$ -Cyclodextrins und ebenfalls als Nebenprodukten gebildeten lang- und kurzkettigen, nicht cyclischen Spaltprodukten vor.

Zur Auftrennung des Gemisches werden nun die Cyclodextrine durch Zerstören der entsprechenden Brombenzol-Clathrate wieder in Lösung gebracht. Eine geeignete Methode hierfür ist die Behandlung des genannten Feststoffgemisches mit heißem oder kochendem Wasser oder Wasserdampf, wobei nach Art einer Wasserdampfdestillation Brombenzol aus dem Gemisch entfernt wird. Aus der schließlich brombenzolfreien, wäßrigen Lösung können die langkettigen, nicht cyclischen Spaltprodukte durch Fällern mit Alkoholen, wie beispielsweise Methanol, abgetrennt werden.

Die Hauptmenge des  $\beta$ -Cyclodextrins wird nun vom Zielprodukt durch Kristallisation abgetrennt. Hierzu wird die wäßrige Lösung zweckmäßigerweise eingeeengt und die Hauptmenge des entstandenen  $\beta$ -Cyclodextrins bei einer Temperatur von 2 bis 10 °C, insbesondere ca. 4 °C, auskristallisiert. Es verbleibt als Überstand eine wäßrige Lösung von  $\gamma$ -Cyclodextrin, dem Zielprodukt, mit kleineren Mengen an  $\beta$ -Cyclodextrin und an kurzkettigen, nicht cyclischen Spaltprodukten. Die Entfernung der kurzkettigen, nicht cyclischen Spaltprodukte ist oftmals nicht erforderlich, da diese Produkte zumeist nur in geringen Mengen vorliegen. Falls eine Abtrennung erwünscht ist, werden in der gleichen Verfahrensweise wie bereits beschrieben die Brombenzol-Clathrate des  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrins gebildet und isoliert. Die kurzkettigen, nicht cyclischen Spaltprodukte verbleiben dabei in Lösung. Danach werden durch Austreiben des Brombenzols aus dem Gemisch die Cyclodextrine wieder in Lösung gebracht.

Beim Eindampfen der erhaltenen Lösung bis zur Trockne oder durch Sprühtrocknung und dergleichen wird als Zielprodukt Roh-Cyclooctaamylose mit einem Reinheitsgehalt von > 90 % erhalten.



Falls ein reineres Produkt erwünscht wird, wird die Roh-Cyclooctaamylose mit Pyridin bei einer Temperatur von 20 bis 60 °C, insbesondere ca. 50 °C, behandelt. Durch Zugabe von Alkohol, z.B. Methanol, zur pyridinischen Suspension fällt Cyclooctaamylose als leicht sedimentierbarer Niederschlag an. Als weiterer Reinigungsschritt bietet sich das Umfällen der Cyclooctaamylose aus wäßriger Lösung mit z.B. Ethanol an.

Das erfindungsgemäße Verfahren gestattet es, ausgehend von Stärke, Cyclooctaamylose in stark verbesserten Ausbeuten sowie in hoher Reinheit herzustellen. Das Verfahrensprodukt findet Verwendung u.a. als Bestandteil von Pflanzenschutzmitteln, Medikamenten, Kosmetika oder Lebensmitteln.

Die Erfindung wird nun anhand von Beispielen näher erläutert:

#### Beispiel 1

150 g Kartoffelstärke wurden in 1 l Wasser, das noch 200 mMol Natriumacetat und 5 mMol Calciumchlorid enthielt, suspendiert und durch Erhitzen auf 120 °C innerhalb von 30 Minuten gelifiziert. Der pH-Wert betrug 6,9. Nach Abkühlen der Mischung auf 70 °C wurden unter Rühren und weiterer Abkühlung 10 mg Cyclodextrin-glykosyltransferase von *Klebsiella pneumoniae*, gelöst in 20 ml eines 20 millimolaren Triethanolaminhydrochlorid-puffers (pH 7,2; 5 mMol Calciumchlorid), zugesetzt. Unter weiterem Rühren wurde auf 40 °C abgekühlt und danach noch 20 mg Cyclodextrin-glykosyltransferase von *Klebsiella pneumoniae* in der gleichen Zubereitung wie oben beschrieben, zugegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 7 Stunden bei 40 °C wurde durch chromatographische Analyse keine Zunahme des primär gebildeten  $\alpha$ -Cyclodextrins mehr festgestellt.

Das Reaktionsgemisch wurde nun mit 26 g Brombenzol versetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 15 Stunden bei 40 °C unter Rühren waren 61,4 Gew.-% der Stärke zu Cyclodextrinen abgebaut. Das Verhältnis von  $\alpha$ - /  $\beta$ - /  $\gamma$ -Cyclodextrin betrug 1 : 4,1 : 2,23.

Die schwerlöslichen Bestandteile der Reaktionsmischung wurden nun durch Zentrifugieren abgetrennt, in 1 l Wasser suspendiert und zum Sieden erhitzt, wobei Brombenzol als Aceotrop mit Wasser abdestillierte.

Die erhaltene leicht trübe Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 1,2 l Methanol versetzt. Nach Abtrennen des gebildeten Niederschlags wurde das Methanol abdestilliert und die wäßrige Lösung soweit eingeeengt, daß die Konzentration an  $\gamma$ -Cyclodextrin 20 Gew.-% betrug. Das erhaltene Konzentrat wurde anschließend 12 Stunden bei 4 °C aufbewahrt.

Es wurden 48 g farblose Kristalle von  $\beta$ -Cyclodextrin erhalten, die von der Lösung abgetrennt und einmal mit 200 ml eiskaltem Wasser gewaschen wurden.

Die vereinigten Überstände wurden mit 7,2 g Brombenzol versetzt und 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene farblose Niederschlag wurde anschließend abzentrifugiert, in 150 ml Wasser aufgenommen und durch Kochen unter aceotropen Abdestillieren des Brombenzols in Lösung gebracht.

Die erhaltene wäßrige Lösung wurde schließlich lyophilisiert. Es wurden 30 g eines Gemisches aus 2,4 g  $\beta$ -Cyclodextrin und 27,6 g  $\gamma$ -Cyclodextrin erhalten.

Die Ausbeute an  $\gamma$ -Cyclodextrin betrug demnach 98,4 %, bezogen auf den  $\gamma$ -Cyclodextrin-Gehalt der Konversionsmischung.

Zur weiteren Reinigung wurde das Gemisch nach 2-stündigem Trocknen bei 105 °C in 100 ml Pyridin suspendiert und 2 Stunden bei 50 °C gerührt. Anschließend wurde mit 200 ml Methanol versetzt. Das erhaltene farblose Präzipitat wurde in 150 ml Wasser suspendiert und durch Erhitzen in Lösung gebracht. Das  $\gamma$ -Cyclodextrin wurde mit 450 ml Ethanol gefällt und nach erneutem Umfällen mit Ethanol im Vakuum getrocknet.

Es wurden 27,2 g  $\gamma$ -Cyclodextrin mit einem Reinheitsgehalt von 98,2 % erhalten. Die Ausbeute, bezogen auf den  $\gamma$ -Cyclodextrin-Gehalt der Konversionsmischung betrug 95,2 %.

Eine Wiederholung des beschriebenen Reinigungsverfahrens führte zu 25,6 g  $\gamma$ -Cyclodextrin vom Reinheitsgehalt 99,8 %.

Die Ausbeute an Reinprodukt betrug, bezogen auf eingesetzte Stärke, 17 %.

## Beispiel 2

200 g Maniok-Stärke wurden in 1 l Wasser mit einem zusätzlichen Gehalt von 200 mMol Natriumacetat und 5 mMol Calciumchlorid suspendiert und durch 30-minütiges Erhitzen auf 120 °C gelifiziert. Der pH-Wert der Reaktionsmischung betrug 6,9. Nach Abkühlen auf 70 °C wurden unter Rühren und weiterer Abkühlung 13 mg Cyclodextrin-Glykosyltransferase von *Klebsiella pneumoniae* in der gleichen Zubereitung, wie im Beispiel 1 beschrieben, zugesetzt. Unter weiterem Rühren wurde auf 43 °C abgekühlt und danach noch 27 mg Cyclodextrin-glykosyltransferase von *Klebsiella pneumoniae* in der gleichen Zubereitung wie oben beschrieben zugegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden bei 43 °C wurde, durch chromatographische Analyse ermittelt, keine weitere Zunahme an initial gebildetem  $\alpha$ -Cyclodextrin ermittelt.

Danach wurden dem Reaktionsgemisch 32,6 g Brombenzol zugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 40 Stunden bei 43 °C waren 59 Gew.-% der Stärke zu Cyclodextrinen abgebaut. Das Verhältnis von  $\alpha$ - /  $\beta$ - /  $\gamma$ -Cyclodextrin betrug 1 : 10,6 : 3,92.

Es wurden die unlöslichen Bestandteile der Konversionsmischung durch Zentrifugation abgetrennt und in 1 l Wasser aufgenommen. Die Suspension wurde zum Sieden erhitzt, wobei Brombenzol als Aceotrop mit Wasser abdestillierte.

Die erhaltene leicht trübe Lösung wurde nun soweit eingeeengt, daß die Konzentration an  $\gamma$ -Cyclodextrin 20 Gew.-% betrug. Das erhaltene Konzentrat wurde 12 Stunden bei 4 °C aufbewahrt.

Es wurden 74 g Roh- $\beta$ -Cyclodextrin erhalten, die von der Lösung abgetrennt und einmal mit eiskaltem Wasser gewaschen wurden.

Die vereinigten Überstände wurden wie gemäß Beispiel 1 beschrieben aufgearbeitet.

Es wurden erhalten:

29,2 g Roh- $\gamma$ -Cyclodextrin, entsprechend einer Ausbeute von 98,6 %, bezogen auf den  $\gamma$ -Cyclodextrin-Gehalt der Konversionsmischung

27 g  $\gamma$ -Cyclodextrin vom Reinheitsgehalt 99,7 %, entsprechend einer Ausbeute, bezogen auf eingesetzte Stärke von 13,5 %.

### Beispiel 3

Es wurde die Arbeitsweise gemäß Beispiel 2 wiederholt, mit der Abänderung, daß anstatt in Gegenwart von 200 mMol Natriumacetat in Gegenwart von 200 mMol Natriumformiat gelifiziert wurde.

10.05.83

11

3317064

Nach einer Gesamt-Inkubationszeit von 48 Stunden waren 57 Gew.-% der Stärke zu Cyclodextrinen abgebaut. Der Anteil an  $\gamma$ -Cyclodextrin betrug 14 Gew.-%.

#### Beispiel 4

Die Arbeitsweise gemäß Beispiel 2 wurde wiederholt, mit der Abänderung, daß anstatt in Gegenwart von 200 mMol Natriumacetat in Gegenwart von 200 mMol Kaliumpropionat gelifiziert wurde.

Nach einer Gesamt-Inkubationszeit von 48 Stunden waren 56,7 Gew.-% der Stärke zu Cyclodextrinen abgebaut. Der Anteil an  $\gamma$ -Cyclodextrin betrug 13,8 %.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**